

盘状红斑狼疮皮损角质形成细胞的蛋白组学初步分析

方 圣, 陈明春, 郭 庆, 曾凡钦, 李伯友, 朱晓浚
(中山大学附属第二医院皮肤科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】建立盘状红斑狼疮皮损和正常皮肤角质形成细胞的双向电泳图谱,分析两者蛋白质的表达差异及特点。【方法】运用固相 pH 梯度双向凝胶电泳分离 6 例盘状红斑狼疮患者皮损及正常皮肤角质形成细胞总蛋白,考马斯亮蓝染色后用 ImageMaster 2D 图象软件比较分析,识别差异蛋白。【结果】盘状红斑狼疮皮损和正常对照电泳图谱平均蛋白点分别为 $1\ 566 \pm 32$ 和 $1\ 682 \pm 38$, 平均匹配点数为 $1\ 286 \pm 14$ 和 $1\ 314 \pm 21$, 匹配率为 82.12% 和 78.12%。分辨差异蛋白点共 22 个, 11 个在皮损高表达, 2 个在皮损组低表达, 有 5 个点仅在病例组表达, 4 个点仅在正常对照组表达。【结论】成功获得分辨率高且重复性较好的蛋白组双向电泳图谱, 识别重复表达的差异蛋白, 为后续蛋白功能研究奠定基础。

关键词: 盘状红斑狼疮; 角质细胞; 蛋白质组

中图分类号: R75 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)06-0749-04

Preliminary Proteomics Analysis of Keratinocytes from Discoid Lupus Erythematosus

FANG Sheng, CHEN Ming-chun, GUO Qing, ZENG Fan-qing, LI Bo-you, ZHU Xiao-jun
(Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To establish 2-dimensional electrophoresis profiles of the protein in keratinocytes from exanthemata and normal skin of discoid lupus erythematosus patients and analyze the difference in protein expression between the two groups. 【Methods】 The total proteins of keratinocytes were separated by immobilized pH gradient 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The differential protein expression was analyzed using ImageMaster 2D analysis software after staining. 【Results】 In the two groups, the average protein spots were $1\ 566 \pm 32$ and $1\ 682 \pm 38$, the average matching rates were 82.12% and 78.12%. Twenty-two differential protein spots were identified, 11 spots were highly expressed and 2 poorly expressed in the group of discoid lupus erythematosus; 5 protein spots were expressed only in the the group of discoid lupus erythematosus while 4 in the normal control group. 【Conclusion】 The 2-dimensional electrophoresis profiles with high resolution and reproducibility of keratinocytes are established. The study on these differential proteins expression will lay a strong foundation for further protein functional research.

Key words: discoid; lupus; keratinocytes; proteome

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(6): 749-752]

盘状红斑狼疮(discoid lupus erythematosus, DLE)是一种皮肤黏膜的慢性结缔组织疾病,多认为是一种自身免疫性疾病,可能与遗传因素和多种刺激因素有关。关于 DLE 的发病机制目前尚未完全明了。以往大量研究提示角质形成细胞介导

的异常免疫反应在狼疮皮损的发生发展过程可能起主导作用^[1-2]。为进一步探讨角质细胞在 DLE 发病中异常蛋白的表达,我们对 DLE 皮损及正常皮肤组织角质形成细胞总蛋白进行双向凝胶电泳分离,并采用 ImagingMaster 2D 图像分析软件对图

收稿日期: 2008-06-24

基金项目: 广东省自然科学基金(5001781)

作者简介: 方圣(1982-),男,安徽池州人,博士生;敦庆,通讯作者,副教授,硕士生导师, E-mail: guoqingzsy@163.com

像进行背景消减、斑点检测、匹配、斑点位置重复性的系统分析,从整体水平寻找差异表达蛋白。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标 本 皮肤组织来自本院皮肤科门诊 DLE 临床确诊患者,要求病史在 6 月以上,近两月未服用影响免疫、结缔组织代谢药物。局麻下常规活检,组织一分为二,一部分送病理检查。患者共 6 例(男性 4 例,女性 2 例),年龄 21 ~ 45 岁,平均年龄 36 岁,病理确诊为 DLE;另外选择性别和年龄相配的健康志愿者正常皮肤为对照组。

1.1.2 主要设备 等电聚焦电泳系统(Ettan IPGphor II)、大型垂直电泳系统(Ettan DALT six)、图象扫描仪,ImagingMaster 2D 5.0 图像分析软件均为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品;

1.1.3 试 剂 胰酶、角质细胞无血清培养基、PBS、Dispase II 购自 GIBCO 公司;蛋白质定量试剂盒、IPG 胶条、尿素、CHAPS、SDS、Tris、丙烯酰胺、TMED、过硫酸铵、三氟乙酸甘油、甘氨酸、溴酚蓝、琼脂糖、考马斯亮蓝 R-250 均为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 原代角质细胞培养 手术切取患者皮损及正常皮肤 3 ~ 4 cm² 置于 PBS 中,剪成 0.5 cm × 0.5 cm 大小,移入 0.25% Dispase II。4 °C 过夜,次日剥取表皮层移入 0.25% 胰酶,37 °C 孵育 15 min 终止消化。筛网滤过,收集细胞。以无血清培养基调定(1 ~ 2) × 10⁶/mL 细胞,苔盼蓝染色计数活细胞,接种于培养瓶中,在 37 °C,体积分数为 5% CO₂,90% 湿度条件下培养。

1.2.2 双向电泳蛋白质样品的制备 培养细胞生长至对数生长期后,清洗 3 次,胰酶消化收集沉淀细胞于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入细胞裂解液,反复冻融 3 个循环,离心 30 min。移取上清液于另一干净 Eppendorf 管中,测蛋白浓度后保存于 -80 °C 备用。

1.2.3 角质细胞总蛋白的双向电泳 第一向固相 pH 梯度等电聚焦:取 450 μg 蛋白质加入水化上样液后均匀加在胶条槽,取出 IPG 胶条缓慢放入槽内,用 IPGphor 等电聚焦仪,如下程序自动进行:①30 V,10 h 泡涨;②200 V,1 h 除盐;③1 000 V,

2 h 除盐;④8 000 V,2 h 线性升压;⑤8 000 V,10 h 等电聚焦。第二向垂直平板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):配制 12% SDS-PAGE 均匀胶。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶上方,低熔点琼脂糖封闭。凝固后垂直电泳系统系统进行电泳。电泳参数设置:第一步 2.5 W/胶,30 min;第二步 17 W/胶,5 h,至溴酚蓝前沿达玻璃板底部停止。考马斯亮蓝染色:将 2-DE 胶放入固定液中固定后,考马斯亮蓝 R-250 中染色,后脱色至背景清晰。凝胶图像分析:通过 Imagescanner II 扫描仪以及 LabScan 扫描软件进行扫描获取图像,利用 ImageMaster2D 软件对图像进行强度校正、点检测、匹配、比较差异等分析。

2 结 果

2.1 人角质形成细胞体外培养

皮肤标本经过两步消化法制成细胞悬液,细胞呈圆形,均质。2 d 后细胞由圆形变成扁平形,细胞体积增大,形成的小集落。7 ~ 10 d 细胞逐渐汇合连接成片,11 ~ 15 d,细胞完全融合,呈铺路石样形态(图 1)。



图 1 无血清培养二周后人角质形成细胞

Fig.1 Keratinocytes cultured for 2 weeks by serum-free media (× 400)

2.2 DLE 皮损和正常皮肤角质细胞双向电泳图谱特征

获得了重复性较好、分辨率较高的 DLE 及正常皮肤角质形成细胞双向电泳图谱。用 ImagingMaster2D 5.0 分析软件进行点分析,皮损组和对照组在凝胶上的平均蛋白质点数分别为 $1\ 566 \pm 32$ 和 $1\ 682 \pm 38$ 。其中的蛋白多集中于 pH 4.5

~ 6.0, 分子质量 14 ~ 90 ku 区域。皮损组和对照组的平均匹配点数分别为 $1\ 286 \pm 14$ 和 $1\ 314 \pm 21$, 匹配率分别为 82.12% 和 78.12%。皮损组和正常组蛋白质点在 IEF 方向的偏差分别为 (0.687 ± 0.243) mm 和 (0.743 ± 0.268) mm, 在 SDS-PAGE 方向上的偏差分别为 (0.897 ± 0.315) mm 和 (0.725 ± 0.254) mm, 具有较好的重复性(图 2)。

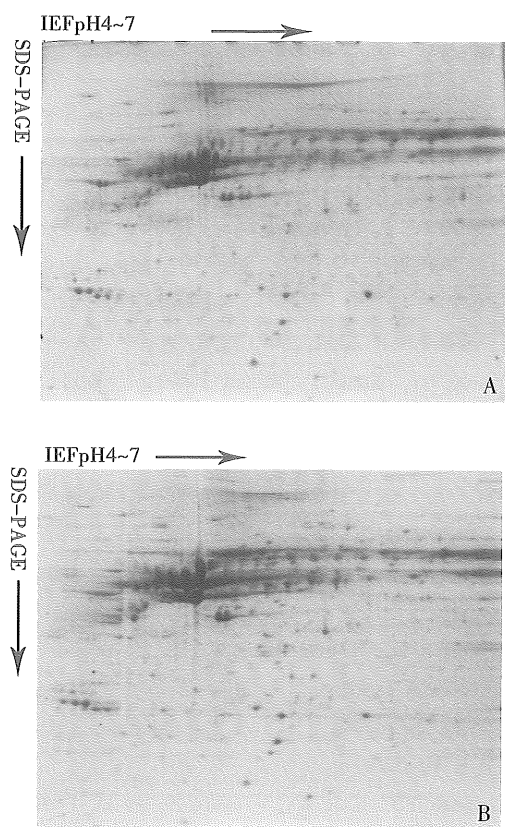


图 2 为 DLE 皮损和正常对照皮肤角质形成细胞总蛋白双向电泳图谱

Fig.2 Two-dimensional gel electrophoresis profiles of total protein from human keratinocytes of control group and DLE lesion

A: keratinocytes of DLE lesion; B: keratinocytes of normal skin

2.3 DLE 皮损和正常皮肤角质形成细胞蛋白质组的表达差异

利用 ImagingMaster2D 5.0 分析软件对图像进行系统分析后, 获得差异蛋白质点数为 22 个, 其中 11 个在皮损高表达, 2 个在皮损组低表达, 4 个点仅在正常对照组表达, 有 5 个点仅在病例组表达(图 3)。DLE 皮损组缺失或新增的蛋白表达点的具体信息见表 1 和表 2。

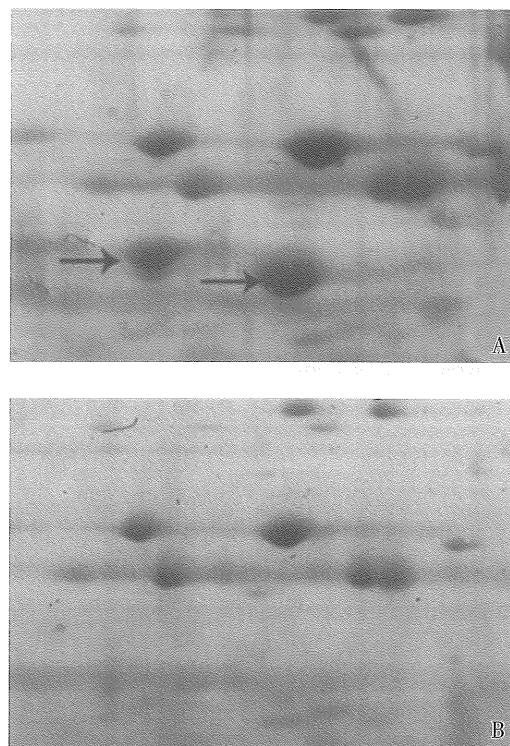


图 3 DLE 皮损中新增的蛋白点

Fig.3 New Protein only expressed in the DLE lesion
A: keratinocytes of DLE lesion; B: keratinocytes of normal skin

表 1 DLE 皮损角质形成细胞新增表达的蛋白点

Table 1 The newly increased proteins in keratinocytes from DLE lesion

Protein ID	PI	MW(ku)	Vol%
785	5.36	26	0.1256
658	5.89	65	0.4789
599	4.59	55	0.3684
997	4.97	83	0.4028
1011	6.07	78	0.8977

PI: isoelectric point; MW: molecular weight; Vol% is relative abundance of protein

表 2 DLE 皮损表达缺失的蛋白点

Table 2 The deficiently expressed proteins in keratinocytes from DLE lesion

Protein ID	PI	MW(ku)	Vol%
596	5.54	81	1.0695
790	6.49	71	0.5632
849	4.87	33	0.3661
954	6.11	45	0.5527

PI: isoelectric point; MW: molecular weight; Vol% is relative abundance of protein

3 讨 论

DLE具体的发病机制仍然不明确,多项研究提示角质形成细胞对疾病的发生发展具有重要影响,参与皮损形成。角质细胞在外界刺激下启动凋亡程序,释放核酸片段,胞内抗原转位于膜表面,诱导自身抗体产生,并通过免疫沉积和介导细胞毒作用诱导皮损形成^[1-3]。Kuhn等^[4]研究证实DLE皮损内角质细胞表面高表达ICAM-1、HLA-DR、和VCAM-1等黏附分子,促进了炎症细胞的向表皮的迁移,参与皮损形成。此外,角蛋白在DLE皮损中呈现典型性改变,K16和K6表达增强,K1表达减弱^[5]。然而,以往研究往往多着眼于一种或几种已知的蛋白,针对了发病环节中局部、个别因素,蛋白质组学则从整体水平探索DLE致病相关蛋白。

本实验首次应用双向凝胶电泳技术分离DLE患者皮损及正常皮肤角质细胞总蛋白质,获得完整双向凝胶电泳图谱,并采用ImagingMaster 2D图像分析软件进行比较分析。发现有22个蛋白质点重复出现表达异常,其中11个在皮损组高表达,2个在皮损组低表达,有5个点仅在病例组表达,4个点仅在正常组表达。我们认为,DLE皮损表达增强的蛋白可能是一些高表达的基因产物,诱导皮损形成等有关;而在DLE皮损中中比对照组缺少或消失的蛋白质,则可能是一些保护或是某些起调节作用的蛋白质。这些蛋白质一方面可能作为诊断的标记物,另一方面也能有助加深对疾病发病机制的了解,还能帮助我们寻找新的药物作用靶点^[6-7]。

据蛋白质斑点的分子质量和等电点以及蛋白质来源等信息,利用蛋白质组搜索引擎Tagident(<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>)对部分差异蛋白质点进行检索,初步判断DLE组中明显上调的ID997可能为热休克蛋白(heat shock protein 90, HSP90)。HSP家族被认为是细胞在一些应激条件下高效表达的一族细胞保护蛋白,参与重要的细胞生理活动,如蛋白质转位、拆叠和装配。有研究表明,狼疮患者外周血单个核细胞

HSP90表达显著增高,且与病情活动密切相关,可能在发病机制中发挥重要作用^[8]。大量文献提示,HSP表达与紫外线密切相关,紫外线通过多条信号传导途径调节角质细胞HSP基因表达^[9],进而可能诱导和加重DLE皮损形成。表1还列出其他表达缺失和新增的蛋白质点,进一步对这些蛋白点进行质谱鉴定和功能性研究,对筛选疾病分子标记和明确发病机制均有着重要的意义。

参考文献:

- [1] Chung JH, Kwon OS, Eun HC, et al. Apoptosis in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus[J]. *Am J Dermatopathol*, 1998, 20(3):233-241.
- [2] Yoshimasu T, Hiroi A, Ohtani T, et al. Comparison of anti 60 and 52 kDa SS-A/Ro antibodies in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus [J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 29 (1):35-41.
- [3] Fisher GJ, Kang S, Varani J, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging [J]. *Arch Dermatol*, 2002, 138(11):1462-1470.
- [4] Kuhn A, Sonntag M, Sunderkotter C. Upregulation of epidermal surface molecule expression in primary and ultraviolet-induced lesions of lupus erythematosus tumidus[J]. *Br J Dermatol*, 2002, 146(5):801-809.
- [5] Ichikawa E, Watanabe S, Takahashi H. Keratin and involucrin expression in discoid lupus erythematosus and lichen planus[J]. *Arch Dermatol Res*, 1997, 289(9):519-526.
- [6] Gomase VS, Kale KV, Tagore S, et al. Proteomics: technologies for protein analysis[J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9(3):213-220.
- [7] 朱永华,刘 炜,石忠松,等. 颅内动脉瘤患者血清蛋白组变化的研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(6):652-656.
- [8] Hu S, Xu Q, Xiao W, et al. The expression of molecular chaperone HSP90 and IL-6 in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2006, 26(6):664-666.
- [9] Trautinger F. Heat shock proteins in the photobiology of human skin [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2001, 63(1-3):70-77.

(编辑 徐 杰)